

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-258728

⑤ Int. Cl.⁵

A 61 K 37/02

識別記号

庁内整理番号

8615-4C

⑬ 公開 平成3年(1991)11月19日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 蛋白質製剤の製造法

⑯ 特 願 平2-57799

⑰ 出 願 平2(1990)3月8日

⑱ 発 明 者 橋 本 元 範 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内

⑲ 発 明 者 資 延 由 利 子 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内

⑳ 発 明 者 武 智 和 男 大阪府枚方市招提大谷2丁目1180番地の1 株式会社ミドリ十字中央研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

㉒ 代 理 人 弁理士 廣瀬 孝美

明 細 書

1. 発明の名称

蛋白質製剤の製造法

2. 特許請求の範囲

医療用蛋白質製剤の製造法において、ウイルスを夾雑する可能性がある蛋白質を陽イオン交換体によって処理する工程を含むことを特徴とするウイルスの実質的に除去された医療用蛋白質製剤の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は医療用蛋白質製剤の製造法に関する。より詳細には、夾雑ウイルスが実質的に除去された医療用蛋白質製剤の製造法に関する。

〔従来の技術〕

ウイルスの混入している恐れのある原料から医薬品を製造する場合があります、その製造工程中にウイルスを不活化するか、除去するための工程を組み込むことが必要である。ウイルス不活化の方法としては、液状または乾燥状態で加熱処理を行っ

て不活化する方法、紫外線照射によって不活化する方法、 β -プロピオラクトン等で化学修飾して不活化する方法等が知られている。また、ウイルスを除去する方法としては、ウイルス粒子の大きさに着目し、一定のポアサイズをもった膜で除去する方法、ポリエチレングリコールのように分子量の大きなもので沈澱除去させることによって除去する方法がある。

〔発明が解決しようとする課題〕

ところで、現在医療上特に問題となっているウイルスは、HIV(エイズウイルス)、HBウイルス、非A非B肝炎ウイルス等の脂質膜を有するウイルスであり、これらウイルスはいずれも蛋白質製剤、特に血漿蛋白質製剤、尿由来製剤においてその夾雑が危惧され、上記の処理によっては当該ウイルスは十分に不活化ないしは除去することができないのが実情である。

従って、本発明の目的は当該ウイルスを蛋白質製剤から、効率的に、かつ有効に除去することによって安全な医療用蛋白質製剤を提供することである。

ある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的は本発明、すなわち医療用蛋白質製剤の製造に際して、ウイルスを夾雑する可能性がある蛋白質を陽イオン交換体によって処理することによって達成される。以下、本発明をより詳細に説明する。

(1) 出発原料

本発明が適用される出発原料は、当該ウイルスの夾雑が危惧される蛋白質であり、例えば人血漿蛋白質、尿由来蛋白質等が例示される。人血漿蛋白質としては、例えば血液凝固因子、免疫グロブリン、トロンピン、プラスミノゲン等が例示され、尿由来蛋白質としては、例えば、ウロキナーゼ、ウロキナーゼ前駆体、リゾチーム等が例示されるが、本発明の処理対象はこれら蛋白質に限定されるものではなく、広く当該ウイルスの夾雑が危惧される蛋白質である。

本発明の処理は、蛋白質製剤の製造工程の任意の工程において実施すればよいが、効率上、最終

マシア社製)、SP-トヨパール®、TSK Gel SP-5PW® (いずれも東ソー社製) 等が挙げられる。

(4) 処理条件

(a) 前処理

本発明の陽イオン交換体による処理を行うに際しては、当該処理前に、陽イオン交換体に対して前処理が行われていることが好ましい。当該前処理としては、通常、緩衝液による処理が例示される。前処理緩衝液としては、具体的には食塩水、リン酸緩衝液等が例示され、より具体的には前記緩衝液にて0.01~0.5M、特に好ましくは0.05~0.2Mの濃度で、pH5~8、好ましくはpH5.5~7にて前もって平衡化された陽イオン交換体が使用される。

(b) 処理条件

処理対象である蛋白質は上記(a)と同様の緩衝液にて調整し、(a)の平衡化処理した陽イオン交換体にアブライする。次いで、(a)と同様の緩衝液で洗浄する。

工程付近で行うことが好ましい。

(2) 対象とされるウイルス

本発明において除去の対象とされるウイルスは、具体的にはVSV、ヘルペスシンプレックス、CHV、シンドビス、ムンプス、ワクチニア、Measle、Rubella、インフルエンザ、ヘルペスゾスター、サイトメガロ、パラインフルエンザ、EB、HIV、HA、HB、NANB、ATL、ECHO、バルボ等が例示される。

(3) 陽イオン交換体

本発明で使用される陽イオン交換体は、陽イオン交換基をリガントとして有する担体であれば特に限定されない。

陽イオン交換基としては、スルホン酸プロピル(SP)、カルボキシメチル(CM)等が例示される。また、担体としては、デキストラン(商品名セファデックス等)、アガロース(商品名セファロース等)等が例示される。陽イオン交換体の具体的な例としては、例えばSP-セファデックス®、CM-セファデックス® (いずれもファル

その後、塩濃度0.01~0.5M、好ましくは0.05~0.2M、pH6~10、好ましくはpH6.7~8.5の緩衝液、例えばクエン酸ナトリウム、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等で目的とする蛋白質を溶出し、回収する。なお、溶出条件は目的とする蛋白質に応じて適宜設定することができる。

また、本発明の陽イオン交換体による処理はバッチ法、カラム法のいずれの方法にても行うことができる。

(5) 精製

回収された蛋白質は、必要に応じて、さらに公知の方法により精製を行ってもよい。かかる精製方法としては、例えばアフィニティークロマト処理等が例示される。

新しくして処理された蛋白質は、常套手段により製剤化され、蛋白質製剤に調製される。

〔効果〕

本発明の方法は簡便であり、また本発明の処理により、蛋白質製剤からウイルスが効率的にかつ、

有効に除去される。

従って、本発明によれば安全な医療用蛋白質製剤が提供される。

【実施例】

本発明をより詳細に説明するために実施例を挙げるが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

実施例 1

正常人血漿から、塩化バリウム吸着法とDEAE-セファデックス カラムクロマトグラフィー法【バジャ、エス、ビーら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Bajaj, S. P., et al., J. Biol. Chem.) 248, 7729 (1973)]によりプロトロンビンを精製し、このプロトロンビンに人胎盤より調製したトロンボプラスチン、人血漿及び塩化カルシウム液を加え、トロンビン変換して、粗製トロンビン(1mg蛋白質当たりのトロンビン活性10単位)を得た。この粗製トロンビンを0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.5)で調整した。一方、S P-セファデックス(ゲル容量: 1.0 ml)

も同じ緩衝液で平衡化した後に粗製トロンビン溶液(10ml)をアブライした。同じ緩衝液で洗浄した後、0.1 Mクエン酸ナトリウム(pH 6.7)でトロンビンを溶出し、回収した。

各画分におけるVSV及びECHOウイルスの量を測定した。ウイルス量は感染価を指標とした。VSVは宿主としてFL細胞を用い、プラーク形成法により、またECHOウイルスは宿主としてHeLa細胞を用い、細胞変性効果観察法により感染価を測定した。その結果を第1表に示す。第1表に示されるように、溶出画分中のウイルス量は著しく減少していることが判明した。

第 1 表

| | V S V | | E C H O ウイルス | |
|---------------|-------|----------|--------------|----------|
| | 対数価 | 比 | 対数価 | 比 |
| 処 理 前 サンプル | 5.2 | 1 | 4.7 | 1 |
| 通過画分 | 5.1 | 1 | 4.1 | 1/4 |
| 洗浄画分 | 4.3 | 1/8 | 2.4 | 1/200 |
| 溶出画分 | < 1.4 | < 1/6000 | < 1.7 | < 1/1000 |

実施例 2

培養人腎細胞を0.1 %ヒト血清アルブミン添加無血清培養液に3日間培養し、培養液を遠心分離し、その上清を凍結して保存した。ブールした培養上清をpH 5.5に調整した後、CM-セファデックスC-50に接触させた。0.16Mリン酸緩衝液(pH 5.5)でカラムを洗浄した後、0.16Mリン酸緩衝液(pH 8.5)で吸着していたウロキナーゼ前駆体を溶出させた。

本ウロキナーゼ前駆体中のVSV及びECHOウイルスの夾雑量は検出限界以下であった。

特許出願人 株式会社ミドリ十字

代 理 人 弁 理 士 廣 瀬 孝 美



PRODUCTION OF PROTEIN FORMULATION

Patent number: JP3258728
Publication date: 1991-11-19
Inventor: HASHIMOTO MOTONORI; others: 02
Applicant: GREEN CROSS CORP:THE
Classification:
- international: A61K37/02
- european:
Application number: JP19900057799 19900308
Priority number(s):

Abstract of JP3258728

PURPOSE:To obtain a safe protein formulation for medical use substantially free from virus by treating protein having possibility of containing virus and readily, efficiently and effectively removing virus by using a cation-exchanger.

CONSTITUTION:Protein such as human plasma protein or protein derived from urine having possibility of containing virus having lipid membrane such as AIDS virus, HB virus or non-A and non-B hepatitis virus is treated with a cation-exchanger of a carrier such as 'SP-Sephadex(R)' or 'CM-Sephadex (R)' (the both are made in Pharmacia Co.) having a cation-exchanging group as a ligand. In said process, the cation-exchanger is preferably pre-treated with a buffer solution such as a phosphoric acid buffer solution to be equilibrated at pH5-8 and said protein is also adjusted by the same buffer solution. Next, resultant system is washed by the same buffer solution as the above-mentioned, thus protein is eluted with a buffer solution having 0.01-0.5M hydrochloric acid concentration and preferably pH6.7-8.5, e.g. sodium citrate and formulated to afford the aimed formulation.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

Family list

2 family member for:

JP3258728

Derived from 1 application.

[Back to JP3258728](#)

1 PRODUCTION OF PROTEIN FORMULATION

Publication info: **JP3127232B2 B2** - 2001-01-22

JP3258728 A - 1991-11-19

Data supplied from the *esp@cenet* database - Patent Abstracts of Japan

(57)

[WHAT IS CLAIMED IS]

[Claim 1]

In a manufacturing process of a protein drug for medical care; A manufacturing process of a protein drug for medical care removed substantially of a virus; wherein; The process that the protein which admixture may make a virus is treated by means of a positive ion exchange body, and remove a virus is included.

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[a field of industrial application]

the present invention relates to a manufacturing process of a protein drug for medical care. More in detail, A manufacturing process of a protein drug for medical care that admixture virus is removed substantially is related to.

[prior art:]

there is a situation producing medical supplies from raw materials with the fear that is contaminated with a virus, *fukatsuka* does a virus within the manufacturing process or, it is necessary to incorporate a process to remove. For a method of viral inactivation, the methods that chemistry is adorned, and *fukatsuka* does are known for liquid state or method that it is heat-treated in a dry state, and *fukatsuka* does, method that *fukatsuka* does by ultraviolet rays irradiation, beta - *puropiorakuton*. In addition, For a method to remove a virus, size of a virus particle is paid its attention to, there is a method to remove by making remove deposition with a big thing of molecular weight like a method, polyethylene glycol removing a constant pore size with a had membrane.

[with a problem to be solved by the invention]

it is about time, and now a virus becoming a problem in particular in medical care is HIV (aids virus), hepatitis B virus, a virus having a lipid membrane such as a non-A fault B hepatitis virus, and the admixture is felt uneasy about in a plasma protein drug, an urine origin drug a protein drug these virus particularly both, the virus is enough *fukatsuka* by the processing, it is the fact that it is, and doing cannot be removed. Thus, It is to provide a safe medical care business protein drug by means of object of the invention removing the virus in the efficiency and availability from a protein drug.

[a means for solving problem]

it is achieved by the object processes the protein which admixture may make a virus on the occasion of production of a protein drug for present invention namely medical care by a positive ion exchange body, and removing a virus. As follows, The present invention is explained more in detail. (1) The starting material which the starting material present invention is applied to is the protein that admixture of the virus is felt uneasy about, and, for example, person plasma protein, urine origin protein are illustrated. For example, for person plasma protein, blood coagulation factor, immune globulin, thrombin, plasminogen are illustrated, for example, for urine origin protein, urokinase, an urokinase precursor, a lysozyme are illustrated, but, a processing object of the present invention is wide not a thing limited to these protein, and admixture of the virus is protein felt uneasy about. Disposal of present invention should be carried out in an arbitrary process of a manufacturing process of a protein drug, but, in the efficiency, it is desirable to do in the vicinity of a last process. (2) As for the virus intended for of the removal, VSV, herupesushinpurekkusu, CHV, Sind screw, mumps, wakuchinia, Measle, Rubella, influenza, herupesuzosuta, saitomegaro, Para - influenza, EB, HIV, HA, HB, NANB, ATL, ECHO, *barupo* are illustrated in the virus present invention intended for concretely. (3) If a positive ion exchange body employed with the positive ion exchange body present invention is carrier comprising the positive ion exchange basis as re-Gantt, is not limited in particular. For the positive ion exchange basis, a sulfonic acid pro pill (SP), carboxymethyl (a commercial) are illustrated. In addition, For carrier, Dextrine (brand name sefadekkusu), agarose (brand name sefarosu) are illustrated. For example, as a specific example of a positive in on exchange body, it is SP - *sefadekkusu* <SUP> Commercial - *sefadekkusu* <SUP> (made in Pharmacia company both) SP - *toyoparu* <SUP> TSKge1SP - 5PW<SUP> (made in Tosoh company both) it is given. (4) If processing by a positive ion exchange body of the processing condition (a) preprocessing present invention is done, when it is done case, preferred what is done preprocessing for a positive ion exchange body before the processing. For the preprocessing, processing by buffer solution is usually illustrated. For preprocessing buffer solution, a solution of salt, phosphoric acid buffer solution are illustrated concretely, particularly preferably pH 5-8, the positive ion exchange body which preferably is made equilibrium with pH 5.5-7 beforehand are employed by the density of 0.05-0.2 M 0.01-0.5 M in the buffer solution more to be concrete. (b) The

protein which is a processing condition processing object does *apurai* in the positive ion exchange health that it balances, and was handled of adjusting (a) in the (a) buffer solution. Subsequently, (a) It is washed in the buffer solution that *to* is similar. Afterwards, 0.01-0.5 salt density M is preferable, and 0.05-0.2 M, pH 6-10 are preferable, and buffer solution of pH 6.7-8.5, protein, by way of example only, to be directed to in citric acid sodium, phosphoric acid buffer solution, tris buffer solution are eluted, it is collected. In addition, An elution condition accepts protein to be directed to, and it can set appropriately. In addition, Disposal of by a positive ion exchange body present invention can be done by a batch method, both methods of a column method. (5) The protein which refined, and is collected may be refined by a better-known method if necessary. For example, for purification to take, *afiniteikuromato* processing is illustrated. The protein which it is done thus, and is treated is made a drug by usual practice, is prepared by a protein drug.

[an effect]

A method of the present invention is simple and easy, and a virus is removed by disposal of present invention effectively and effectively again by a protein drug. Thus, According to the current invention, a protein drug for safe medical care is offered.

[an example]

an example is given to explain the present invention more in detail, but, the present invention is not what limited thing by means of these. From example 1 original ordinary man plasma, prothrombin is refined by a barium chloride adsorption and DEAE - *sefadekkusukaramukuromatogurafi* method

[baja, S, P, journal of biological chemistry (Bajaj, S.P., et al., J., Biol. Chem.) 248, 7729 (1973)]

, thromboplastin prepared than the person placenta, person plasma and calcium chloride liquid are added to this prothrombin, thrombin was converted, and slipshod manufacture thrombin (ten thrombin activity units per 1mg protein) was got. This slipshod manufacture thrombin was adjusted in 0.1M phosphoric acid buffer solution (pH 6.5). On the other hand, SP - *sefadekkusu* (gel capacity:) After 1.0ml) became equilibrium in the same buffer solution, too, *apurai* did slipshod manufacture thrombin solution (10ml). After having washed in the same buffer solution, thrombin is eluted in 0.1M citric acid sodium (pH 6.7), it was collected. VSV in *kakukakufun* and quantity of ECHO virus were measured. The quantity of virus assumed an infection value an index. VSV uses a FL cell as a host, by the plaque formation method, ECHO virus uses a Hela cell as a host again, an infection value was measured by cell denaturation ineffectual observation method. The result is shown to table 1. As shown in table 1, it was recognized that quantity of virus of **dekakufunchu* decreased remarkably.

第 1 表

| | V | S | V | E C H O ウ イ ル ス | |
|------------------|-------|----------|-------|-----------------|--|
| | 対 数 価 | 比 | 対 数 価 | 比 | |
| 処 理 前 サ ン プ ル | 5.2 | 1 | 4.7 | 1 | |
| 通 過 画 分 | 5.1 | 1 | 4.1 | 1/4 | |
| 洗 浄 画 分 | 4.3 | 1/8 | 2.4 | 1/200 | |
| 溶 出 画 分 | < 1.4 | < 1/6000 | < 1.7 | < 1/1000 | |

An example 2 culture person kidney cell is cultured to 0.1% human serum albumin addition no serum culture fluid for three days, centrifugation does culture fluid, the supernatant was frozen, and it was saved. After having adjusted a pooled culture supernatant to pH 5.5, it made come in contact with commercial - *sefadekkusu* C- 50. After having washed a column in 0.16M phosphoric acid buffer solution (pH 5.5), it made elute an urokinase precursor adsorbed in 0.16M phosphoric acid buffer solution (pH 8.5). VSV in this urokinase precursor and the quantity of admixture of ECHO virus were equal to or less than a search limit.